

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Martin Baroch

STANOVENÍ SYNTETICKÝCH ANTIOXIDANTŮ POMOCÍ
HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ NA DETEKTORU
Z UHLÍKOVÉ PLSTI

Determination of synthetic antioxidants using HPLC with
electrochemical detection on carbon felt detector

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2017

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
Martin Baroch

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí práce, RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D., za její pomoc, cenné připomínky a za čas, který mi velmi ochotně věnovala. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za nesčetné rady při řešení problémů. A v neposlední řadě velký dík patří celé laboratoři 112 a katedře analytické chemie za všemožnou pomoc, nápady a trpělivost.

Klíčová slova

HPLC, coulometrická detekce, uhlíková plst', elektroda z uhlíkové plsti, syntetické antioxidanty, spektrometrická detekce, gradientová eluce, průtoková cela, butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen, terciární butylhydrochinon, propylgallát

Key words

HPLC, coulometric detection, carbon felt, carbon felt electrode, synthetic antioxidants, spectrometric detection, gradient elution, flow cell, Butylhydroxyanisole, Butylhydroxytoluene, tert-Butylhydroquinone, Propyl gallate

Abstrakt

V této práci bylo cílem nalézt vhodné podmínky pro HPLC separaci s následnou coulometrickou detekci na detektoru z uhlíkové plsti. Stanovovanými látkami byly syntetické fenolické antioxidanty, konkrétně propylgallát (PG), terciální butylhydrochinon (tBHQ), butylhydroxyanisol (BHA) a butylhydroxytoluen (BHT).

Pro úplné oddělení analytů bylo nutné použít gradientovou eluci. Jako mobilní fáze byl použit methanol a acetátovo-fosfátový pufr o pH 4,5. Obsah methanolu v mobilní fázi se během 8 minut lineárně zvyšoval z 55 % na 95 % a následně byl tento obsah držen 2 minuty. Jako stacionární fáze byla použita kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 µm) (LichroCART). Potenciály vkládané na pracovní elektrodu z uhlíkové plsti byly 1,40 V pro BHT a 0,80 V pro ostatní látky. Dva potenciály byly zvoleny pro lepší odezvu detektoru na BHT.

Závislost velikosti signálu na koncentraci byla sledována v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ pro každý analyt. V tomto rozmezí jsou kalibrační závislosti lineární. Nepřesná měření byla získána u BHT. To může být, mimo jiné, zapříčiněno právě vysokým potenciálem pracovní elektrody.

K ověření metody byly použity dva reálné vzorky, psí granule a slunečnicový olej. V těchto vzorcích bylo nalezeno pouze tBHQ a BHA. Pro zbylé analyty se nepodařilo najít vhodný reálný vzorek.

Abstract

The aim of this work was to find suitable conditions for HPLC separation with subsequent coulometric detection on a carbon felt detector. The analytes were synthetic phenolic antioxidants, specifically propyl gallate (PG), tert-Butylhydroquinone (tBHQ), butylated hydroxyanisole (BHA) and butylhydroxytoluene (BHT).

For the complete separation of the analytes, gradient elution was required. As a mobile phase methanol and acetate-phosphate buffer of pH 4.5 were used. Concentration of methanol in mobile phase was linearly increased from 55 % to 95 % during 8 minutes and next 2 minutes was concentration of methanol held at 95 %. As a stationary phase was used Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 µm) (LichroCART) column. Potentials putted on a carbon-fiber working electrode were 1.40 V for BHT and 0.80 V for other analytes. Two potentials were chosen for a better detector response to BHT.

The calibration dependence of the signal on the concentration was observed in the concentration range of $10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ for all analytes. In this range the dependencies are linear. Inaccurate measurements were obtained for BHT. This can be caused by a very high potencial of working electrode.

For verify of method were used two real samples, dog food and sunflower oil. In this samples only tBHQ and BHA were found. For the remaining analytes a suitable real sample wasn't found.

Seznam použitých zkratk a symbolů

BHA – Butylhydroxyanisol

BHT – Butylhydroxytoluen

tBHQ – Terciární butylhydrochinon

PG – Propylgallát

CF – Uhlíková plst' (Carbon Felt)

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PEEK – polyetheretherketon

MECC – micelární elektrokinetická kapalinová chromatografie

LOD – mez detekce (limit of detection)

LOQ – mez stanovitelnosti (limit of quantification)

p.a. – pro analýzu

pH – záporná hodnota vodíkového exponentu

E – potenciál

ρ – hustota

Obsah

| | | |
|-------|--|--------|
| 1 | Úvod..... | - 9 - |
| 1.1 | Cíle práce..... | - 9 - |
| 2 | Teoretická část | - 10 - |
| 2.1 | Antioxidanty..... | - 10 - |
| 2.1.1 | Butylhydroxyanisol | - 12 - |
| 2.1.2 | Terciární butylhydrochinon | - 12 - |
| 2.1.3 | Butylhydroxytoluen | - 13 - |
| 2.1.4 | Propylgallát..... | - 13 - |
| 2.2 | Analytické metody stanovování syntetických antioxidantů..... | - 14 - |
| 2.3 | Průlinčité uhlíkové elektrody | - 16 - |
| 2.4 | Uhlíková plst'..... | - 17 - |
| 3 | Experimentální část..... | - 18 - |
| 3.1 | Použitá aparatura a přístroje | - 18 - |
| 3.2 | Konstrukce pracovní elektrody | - 18 - |
| 3.3 | Další použité vybavení | - 19 - |
| 3.4 | Příprava použitých chemikálií..... | - 20 - |
| 3.4.1 | Příprava roztoků antioxidantů | - 20 - |
| 3.4.2 | Příprava acetátovo-fosfátového pufru | - 20 - |
| 3.5 | Optimalizace metody..... | - 21 - |
| 3.6 | Kalibrace metody | - 21 - |
| 3.7 | Zpracování vzorků psích granulí a olejů | - 22 - |
| 4 | Výsledky a diskuze | - 23 - |
| 4.1 | Vliv chromatografického programu na separaci | - 23 - |
| 4.2 | Vliv pH a potenciálu pracovní elektrody | - 26 - |
| 4.3 | Opakovatelnost..... | - 30 - |
| 4.4 | Kalibrační závislosti | - 31 - |
| 4.5 | Stanovení v oleji..... | - 35 - |
| 4.6 | Stanovení v psích granulích | - 37 - |
| 5 | Závěr | - 38 - |
| 6 | Seznam použité literatury | - 40 - |

1 Úvod

1.1 Cíle práce

Cílem práce je zhodnotit funkčnost a použitelnost detektoru z uhlíkové plsti ve spojení s HPLC, s čímž souvisí i nutnost optimalizace podmínek HPLC separace (tj.: mobilní fáze, stacionární fáze, průtok a elučního programu) pro dostatečné oddělení jednotlivých analytů a nalezení vhodných podmínek pro coulometrickou detekci na detektoru z uhlíkové plsti, zejména optimálního pH a potenciálu pracovní elektrody.

Dalším krokem je nalezení a vyhodnocení závislostí mezi koncentracemi analytů a velikostí signálu elektrochemické detekce a stanovení meze detekce a stanovitelnosti metody.

Posledním krokem je extrakce a stanovení analytů z reálných vzorků kvůli ověření schopnosti analýzy reálných vzorků

2 Teoretická část

2.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky přírodního nebo syntetického původu, které zpomalují nebo zastavují oxidační procesy, tvorbu volných radikálů a autoxidaci tuků [1]. Tyto procesy, respektive jejich produkty (aldehydy, ketony, organické kyseliny apod.), zapříčiňují změnu v kvalitě produktu, které mohou zhoršovat kvalitu potravinářského výrobku, případně negativně ovlivňovat zdraví člověka [2, 3]. Právě do potravinářských výrobků obsahujících tuky se antioxidanty přidávají nejčastěji.

Syntetické fenolické antioxidanty, jako jsou galláty, tBHQ, BHA a BHT, se využívají kvůli jejich nízké ceně, velké dostupnosti a mnohem vyšší účinnosti, než mají přírodní antioxidanty, např. flavonoidy, karotenoidy a thiolové sloučeniny. [4-6]

Z legislativního hlediska patří antioxidanty do skupiny látek nazývané „potravinářské přídatné látky“, což jsou látky záměrně přidávané do potravin pro technologické účely. Těmi může být prodloužení doby trvanlivosti nebo zlepšení senzorických vlastností (chuť, vůně, vzhled). Mezi potravinářské přídatné látky patří například také konzervanty, barviva, kyseliny, regulátory kyselosti, plnidla, emulgátory a další. [7]

Obsah antioxidantů v potravinách je regulován příslušnými nařízeními, přičemž maximální přípustná koncentrace jednotlivých antioxidantů (ať ve směsi nebo zvlášť) se liší podle typu potravin a kombinace antioxidantů. Níže je uvedena tabulka studovaných antioxidantů a jejich maximálních povolených množství v potravinách. [7, 8]

Tab. 1 - Maximální povolené koncentrace vybraných antioxidantů v potravinových výrobcích. Převzato a upraveno z [8]

| Antioxidanty | Maximální množství (mg kg ⁻¹ nebo mg dm ⁻³) | Výrobek |
|--|--|---|
| PG, tBHQ a BHA jednotlivě nebo v kombinaci | 200 | Tuky a oleje pro výrobu tepelně opracovaných potravin; fritovací oleje a fritovací tuk (kromě oleje z olivových výlisků), vepřové sádlo, rybí tuk, hovězí a ovčí lůj, drůbeží tuk |
| BHT | 100 | |
| PG, tBHQ a BHA | 200 | Zpracované ořechy |
| | | Sušené mléko pro prodejní automaty |
| | | Snacky na bázi obilovin |
| | | Předvařené obiloviny |
| | | Směsi pro přípravu moučníků |
| | | Dehydratované maso |
| | | Dehydratované polévky a vývary |
| | 25 | Dehydratované brambory |
| PG, tBHQ, BHA a BHT | 400 | Doplňky stravy |
| | | Žvýkačky |
| | 200 | Ochucovací a koření přípravy |

2.1.1 Butylhydroxyanisol [9]

Sumární vzorec: $C_{11}H_{16}O_2$

Relativní molekulová hmotnost: 180,27

CAS číslo: 25013-16-5 [10]

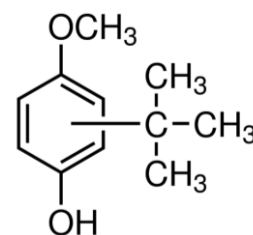
IUPAC název: 2-tert-Butyl-4-methoxyphenol a 3-tert-butyl-4-methoxyphenol (směs)

Vzhled: Bílé, případně nažloutlé krystaly nebo voskovitá pevná látka s charakteristickým zápachem

Rozpustnost: Ve vodě nerozpustný, rozpustný v olejích a organických rozpouštědlech (methanol, propylenglykol)

Využití: Antioxidant pro nenasycené lipidy a antimikrobiální přísada

Toxicita: Podezření na vznik tumorů v předžaludku přežvýkavců.



2.1.2 Terciární butylhydrochinon [9]

Sumární vzorec: $C_{10}H_{14}O_2$

Relativní molekulová hmotnost: 166,24

CAS číslo: 1948-33-0 [10]

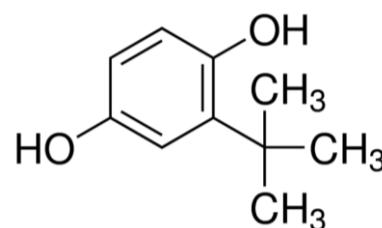
IUPAC název: 2-(1,1-Dimethylethyl)-1,4-benzenediol

Vzhled: Bílé nebo světlohnědé pevné krystaly s charakteristickým zápachem

Rozpustnost: Velmi omezeně rozpustný ve vodě, rozpustný v tucích a organických rozpouštědlech (ethanol, propyleglykol)

Využití: Zabraňuje oxidativnímu žluknutí tuků a vzniku volných radikálů

Toxicita: Prokázána mutagenita *in vivo*



2.1.3 Butylhydroxytoluen [9]

Sumární vzorec: $C_{15}H_{24}O$

Relativní molekulová hmotnost: 220,39

CAS číslo: 128-37-0 [10]

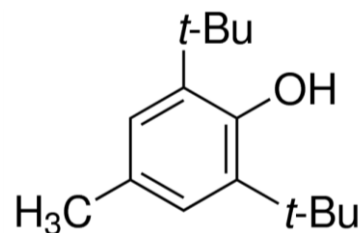
IUPAC název: 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol

Vzhled: Bílé krystaly s lehkým zápachem

Rozpustnost: Nerozpustný ve vodě a propylenglykolu, rozpustný v olejích a ethanolu

Využití: Antioxidant, zabraňuje vzniku radikálů během oxidativního žluknutí, antimikrobiální přísada

Toxicita: Nebyly zjištěny závažné bezpečnostní problémy



2.1.4 Propylgallát [9]

Sumární vzorec: $C_{10}H_{12}O_5$

Relativní molekulová hmotnost: 212,22

CAS číslo: 121-79-9 [10]

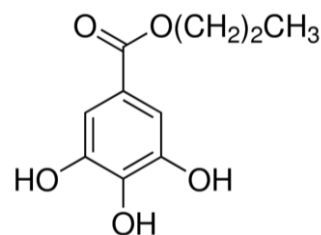
IUPAC. název: Propyl 3,4,5-trihydroxybenzoate

Vzhled: Jemný bílý prášek nebo krystaly, bez zápachu s lehce nahořklou chutí

Rozpustnost: Velmi omezeně rozpustný ve vodě, rozpustný v tucích a dobře rozpustný v ethanolu.

Využití: Zabraňuje vzniku radikálů během oxidativního žluknutí nenasycených tuků

Toxicita: Nebyly zjištěny závažné bezpečnostní problémy



2.2 Analytické metody stanovení syntetických antioxidantů

Během posledních let se zájem o stanovení syntetických antioxidantů zvýšil zejména kvůli možné toxicitě těchto látek a jejich produktů na organismy. [11]

Nejsnazší metodou pro oddělení PG, BHA, tBHQ a BHT z matric vzorků je přímá extrakce organickým rozpouštědlem. Nejčastěji se využívá ethanol [12, 13], methanol [14-16] případně methanol v kombinaci s acetonitrilem [2]. Další možností je extrakce na pevném sorbentu (SPE) [3]. Nevýhodou přímé extrakce je nedostatečný přechod analytů mezi některými matricemi vzorku a extrakčním činidlem a relativně nízké koncentrace v reálných vzorcích. Z toho důvodu se využívá opakovaných extrakcí s následným spojením extraktů, případně jejich zakoncentrování odpařením extrakčního činidla a rekonstitucí [3, 14, 16]. Nevýhodou při odpařování jsou možné ztráty analytů, zejména BHT vlivem odpaření a tBHQ vlivem oxidace [1].

Nejčastěji používanými metodami pro navazující analýzu jsou separační metody, typicky HPLC ve spojení s přímou spektrometrickou detekcí v UV oblasti [2, 3, 5, 14, 15, 17], případně s coulometrickou detekcí [18], nebo micelární kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí [12, 13]. Kromě separačních technik bylo vyvinuto i několik metod elektrochemických, jako jsou například cyklická voltametrie, voltametrie čtvercových vln nebo diferenciální pulsní voltametrie. [14, 19-21]

Použití HPLC je u těchto analytů často limitováno nutným kompromisem mezi izokratickou elucí za cenu dlouhých retenčních časů [16-18, 22] nebo nedostatečných rozlišení píků, ale snadnou detekcí a na straně druhé použitím gradientové eluce a nižších retenčních časů [17], ovšem s problémy při detekci, jako je drift základní linie, případně nízká vodivost roztoku při použití elektrochemické detekce za vysokých obsahů organické složky v mobilní fázi. Obecně platí, že u elektrochemických detekcí je dosahováno nižších detekčních a kvantifikačních mezí (viz tab. 2) a zároveň vyšších lineárních rozsahů než u detekcí v UV oblasti. [1] Relativní směrodatné odchylky opakovatelností jednotlivých metod se pohybují mezi 0,3 – 5,7 % (viz tab. 3)

Tab. 2 – Srovnání opakovatelnosti vybraných separačních metod, opakovatelnost vyjádřená jako RSD.

| [%] | [23] | [16] | [5] | [13] | [4] | [2] |
|------|-----------|------|-----------|------|-----------|-----------|
| PG | 1,7 – 2,1 | --- | | 0,62 | 0,4 – 1,0 | |
| tBHQ | 1,8 – 2,3 | 2,0 | 1,5 – 2,1 | 0,76 | 1,8 – 5,7 | 1,1 – 3,8 |
| BHA | 2,1 – 2,5 | 3,4 | | 2,0 | 0,3 – 0,8 | |
| BHT | 1,8 – 2,8 | --- | | 2,0 | 0,7 – 3,0 | |

Tab. 3 – Srovnání LOD a LOQ vybraných separačních metod.

| Zdroj | Separací metoda | Detekce | Analyt | LOD x10 ⁻⁶ [mol · dm ⁻³] | LOQ x10 ⁻⁶ [mol · dm ⁻³] |
|----------|--------------------|--------------|--------|--|--|
| [2] | HPLC | UV (280 nm) | PG | 1,41 | 4,72 |
| | | | tBHQ | 3,01 | 10,2 |
| | | | BHA | 2,77 | 9,43 |
| | | | BHT | 2,27 | 7,71 |
| [5] | HPLC | UV (280 nm) | PG | 7,55 | 25,0 |
| | | | tBHQ | 54,1 | 180 |
| | | | BHA | 11,1 | 37,2 |
| | | | BHT | 25,0 | 83,0 |
| [12, 13] | MECC | Amperometrie | PG | 0,29 | 0,97 |
| | | | tBHQ | 0,80 | 2,7 |
| | | | BHA | 1,0 | 3,3 |
| | | | BHT | 2,7 | 9,0 |
| [15] | HPLC | UV (280 nm) | tBHQ | 0,60 | 2,01 |
| | | | BHA | 1,11 | 3,33 |
| | | | BHT | 0,91 | 2,72 |

2.3 Průlinčité uhlíkové elektrody

Pro průtokové analytické metody, jako je např. HPLC a FIA, přináší výhody najít takový materiál pro elektrody, který je porézní a tím má velký specifický povrch a zároveň umožňuje, aby jím proud mobilní fáze mohl protékat s co možná nejmenším hydrodynamickým odporem. Z těchto důvodů se k tvorbě uhlíkových průlinčitých (průtokových porézních) elektrod využívá skelný uhlík (GC) at' už v čisté podobě [24-26] případně různě modifikovaný (např. potažený zlatem nebo rtutí [24]), síťovitý skelný uhlík (RVC) [25, 27-29] nebo uhlíkové nanotrubičky [30] a v neposlední řadě uhlíková plst' [31, 32], která byla zvolena i pro tuto práci.

Všechny tyto materiály umožňují naplnit coulometrickou celu požadovaného tvaru tak, aby měla rychlou odezvu a co nejmenší mrtvý objem a s tím související minimální rozmývání píků [25]. Další výhodou, náležící uhlíkové plsti, je minimální nutnost úpravy pro použití jako elektrody (výjimku tvoří potřeba odstranit zachycené vzduchové bubliny v případě práce ve vodném prostředí [31, 32]) oproti GC a RVC, kde jsou zapotřebí pomocné materiály pro spojení uhlíkových částic a jejich následné plnění do elektrodových pouzder.

2.4 Uhlíková plst'

Uhlíková plst' je materiál složený z neuspořádaně propletených vláken o průměru přibližně 7 μm . Díky svým příznivým vlastnostem je vhodným materiálem pro zhotovování elektrod, u kterých je požadován velký povrch. Takové se využívají např. při coulometrii [31], elektrolýze [33] nebo tvorbě baterií pro uložení velkého množství elektrické energie [34, 35]. Mezi tyto vlastnosti lze řadit nízkou cenu, fyzikálně-chemickou stabilitu [31], snadnou manipulaci a s tím spojenou možnost úpravy plsti do libovolných tvarů a také velký specifický povrch. Právě velký specifický povrch umožňuje vysokou proudovou účinnost, a tedy i stoprocentní, nebo této hodnotě se blížící, konverzi analytu, což je principem coulometrie. [31]

Nevýhodou tohoto materiálu je nízká smáčivost, zapříčiněná vzduchem zachyceným mezi jednotlivými vlákny [31, 32]. Vzhledem k tomu je obtížné tento materiál používat bez předchozích úprav ve vodném prostředí. Pro odstranění tohoto problému bylo vyvinuto několik postupů. Mezi tyto např. patří umístění uhlíkové plsti na několik hodin do ultrazvukové lázně naplněné vodou nebo používaným elektrolytem kvůli odstranění vzduchu zachyceného mezi vlákny. Dalším způsobem je opláchnutí bezvodým, ale s vodou mísitelným rozpouštědlem, jako je methanol nebo aceton. [36, 37].

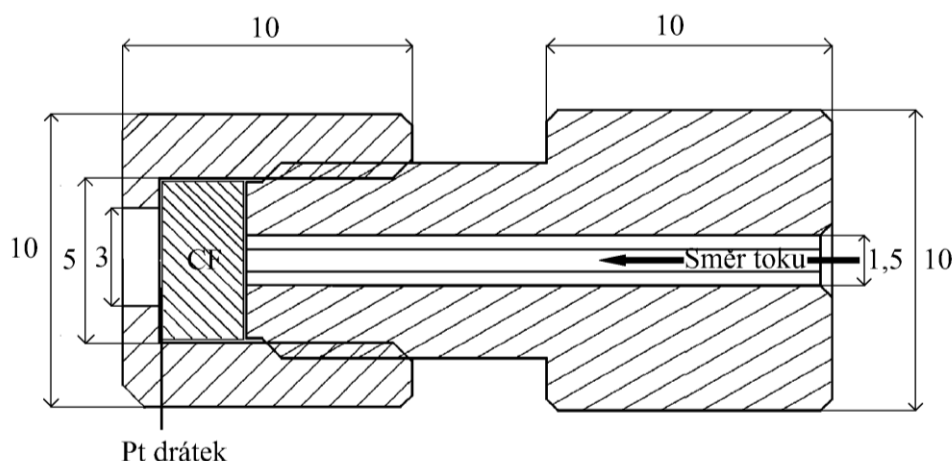
3 Experimentální část

3.1 Použitá aparatura a přístroje

Pro HPLC měření byla použita sestava skládající se z degasseru DG 4014 (Ecom, Česká republika) a vysokotlaké gradientové pumpy BETA 10 (Ecom, ČR). K separaci analytů byla použita chromatografická kolona Lichrospher® RP-18 (125 × 4 mm, 5 μm). Pro dávkování analytů na kolonu byl použit šesticestný dávkovací ventil (Ecom, Česká republika) se smyčkou objemu 20 μl. K detekci sloužily dva za sebou zapojené detektory. První byl UV/VIS detektor Sapphire (Ecom, Česká republika) a druhým byl detektor ADLC 1 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) v tříelektrodevém zapojení, kdy pracovní elektrodou byla elektroda z uhlíkové plsti, jako referentní byla použita argentschloridová elektroda (3M KCl) a pomocnou tvořila platinová elektroda.

3.2 Konstrukce pracovní elektrody

Tělo pracovní elektrody se skládalo z ploché ferule, přívodní kapiláry a čepičky, do které byl vyvrtán 3mm otvor, kudy odtékala mobilní fáze. Uhlíková plst' (CF; Karbotechnik, Česká republika), tvořící náplň elektrody, byla umístěna do čepičky a zašroubováním ferule s kapilárou lehce stlačena, aby bylo zajištěno přímé napojení proudu mobilní fáze na povrch plsti. Vodivé spojení mezi detektorem a uhlíkovou plstí bylo zajištěno platinovým drátkem, který byl prostrčen tělem čepičky těsně pod plst'. Schéma sestavení celé elektrody je zobrazeno na Obr. 1.



Obr. 1 - Schéma pracovní elektrody

3.3 Další použité vybavení

pH metr: digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK)
s kombinovanou skleněnou elektrodou

Magnetická míchačka: Magnetic stirrer MS 3000 (Biosan, Litva)

Ultrazvuková čistička: PS 02000A (Powersonic, USA)

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP (Sartalex, Česká republika)

Nylonové filtry na injekční stříkačky (0,45μm, průměr 13 mm; Fisher Scientific)

3.4 Příprava použitých chemikálií

3.4.1 Příprava roztoků antioxidantů

Zásobní roztoky antioxidantů o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byly připraveny navážením potřebného množství propylgallátu (Sigma-Aldrich), terciárního butylhydrochinonu (97%, Sigma-Aldrich), butylhroxyanisolu ($\geq 98,5\%$, Sigma-Aldrich) a butylhydroxytoluenu ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) na analytických vahách a následným převedením navážky do odměrné baňky a jejím rozpuštěním v methanolu. Takto připravené roztoky byly uchovávány v chladničce.

Roztoky používané k měření ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) byly připraveny odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku a doplněny po rysku směsí methanol:deionizovaná voda (1:1, v/v).

3.4.2 Příprava acetátovo-fosfátového pufru

Kyselá složka pufru byla připravena odpipetováním potřebného množství kyseliny octové (99% p.a., $\rho = 1,05 \text{ g cm}^{-3}$, Lach-Ner, Česká republika) a kyseliny o-fosforečné (85 % p.a., $\rho = 1,70 \text{ g cm}^{-3}$, Lach-Ner, Česká republika) pro požadovanou koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem.

Alkalická složka pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ byla připravena odměřením potřebného množství roztoku hydroxidu sodného (8 M, Fluka Analytica, Německo) a doplněním destilovanou vodou na výsledný objem.

Vlastní pufr byl připraven odlitím kyselé složky a jejím dotitrováním alkalickou složkou na požadované pH.

3.5 Optimalizace metody

Pro optimalizaci podmínek separace byla používána pouze spektrometrická detekce v UV oblasti při vlnové délce 280 nm. Separační účinnost byla sledována v závislosti na poměru methanol:pufr v mobilní fázi a na chromatografickém programu. Pro identifikaci píků byly použity roztoky jednotlivých antioxidantů o koncentracích $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Při optimalizaci coulometrické detekce byla pracovní CF elektroda zapojena sériově za UV detektor pomocí PEEKové kapiláry. Pracovní elektroda byla společně s referenční argentchloridovou a pomocnou platinovou elektrodou umístěna do přepadové nádoby; ta byla před započetím měření naplněna pufrům používaným v mobilní fázi. K samotné optimalizaci detekce byly použity optimální separační podmínky, tedy gradientový program: 0 min: 55 % A, 8 min 95 % A, 10 min 95 % A (A: methanol, B: pufr). Optimální podmínky coulometrické detekce byly sledovány v závislosti na pH pufru a různém potenciálu vkládaném na pracovní elektrodu.

Opakovatelnost elektrochemické detekce byla zjišťována při optimálních podmínkách separace a při potenciálech pracovní elektrody 0,80 V a 1,40 V. Měření pro určení opakovatelnosti byla prováděna celkem 10krát pro každý potenciál.

Pro určování optimálních podmínek separace, coulometrické detekce a pro stanovení opakovatelnosti měření byly používány ekvimolární roztoky analytů o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.6 Kalibrace metody

Kalibrační závislost byla proměřována pomocí elektrochemické detekce, za optimálních separačních a detekčních podmínek, kdy jako kalibrační roztoky byly použity ekvimolární roztoky antioxidantů v rozsahu koncentrací od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Získané body byly následně proloženy lineární funkcí a statisticky zpracovány.

3.7 Zpracování vzorků psích granulí a olejů

Pevný vzorek granulí (Bono® Mini drůbeží) byl rozdrcen a homogenizován pomocí třecí misky s tloučkem. Suspenze přibližně přesně 1 g vzorku v 5 ml methanolu byla na 15 minut umístěna do ultrazvukové lázně. 3 ml supernatantu byly zředěny v poměru 1:1 pufrem používaným v mobilní fázi. Takto připravený vzorek byl filtrován přes 0,45µm filtr a vzniklý filtrát byl dávkován na chromatografickou kolonu.

Pro určení výtěžnosti extrakce byly v 50 ml vzorku oleje rozpuštěny všechny čtyři antioxidanty v takovém množství, aby jejich jednotlivé koncentrace byly 200 mg dm⁻³. Takto připravený roztok byl následně ředěn olejem na koncentrace 100, 10 a 1 mg dm⁻³. Pomocí 2 ml methanolu byly následně antioxidanty extrahovány ze 2 ml těchto vzorků. Methanolvá fáze byla po odebrání smísena se stejným objemem destilované vody a filtrována přes 0,45µm filtr. Filtrát byl následně dávkován na chromatografickou kolonu. Jednotlivé koncentrace byly měřeny v triplicátech.

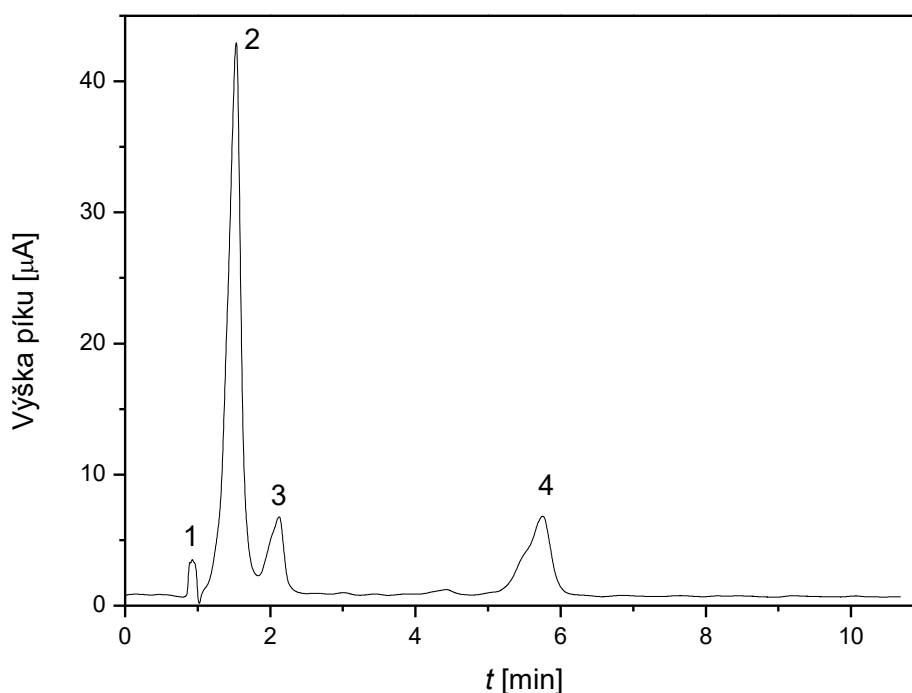
Vzorek oleje o objemu 20 ml byl smísen s 20 ml methanolu. Směs byla 15 minut ultrazvukována a protřepána v dělicí nálevce. Po oddělení byla horní methanolvá fáze odpařena v proudu dusíku při teplotě 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu a následně zředěn v poměru 1:1 deionizovanou vodou. Takto připravený vzorek byl filtrován přes 0,45µm filtr a dávkován na chromatografickou kolonu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vliv chromatografického programu na separaci

Nalezení vhodného chromatografického programu je důležité pro úspěšnou separaci všech analytů přítomných ve vzorku. Během měření byla zkoušena jak izokratická eluce při různých poměrech methanol:pufr v mobilní fázi, tak různé gradientové programy. V této části práce byla mobilní fáze pufrována acetátovo-fosfátovým pufrům na pH = 2,5 a k detekci analytů byl použit spektrometrický detektor při vlnové délce 280 nm.

Izokratická eluce není vhodná pro separaci analytů z důvodu nedostačující eluční síly při použití 60% obsahu organické složky v mobilní fázi, jak je patrné na obr. 2, kde jsou druhý a třetí pík téměř dostatečně odděleny, ale nedochází k vymytí BHT z kolony. Opačně, při použití 80% obsahu organické složky v mobilní fázi (viz obr. 3) nedochází k oddělení PG a tBHQ, které se spojují v jeden pík a není tedy možné určit výšky jednotlivých píků. Výhodou vysokého obsahu organické složky, je její dostatečná eluční síla pro vymytí BHT z kolony.

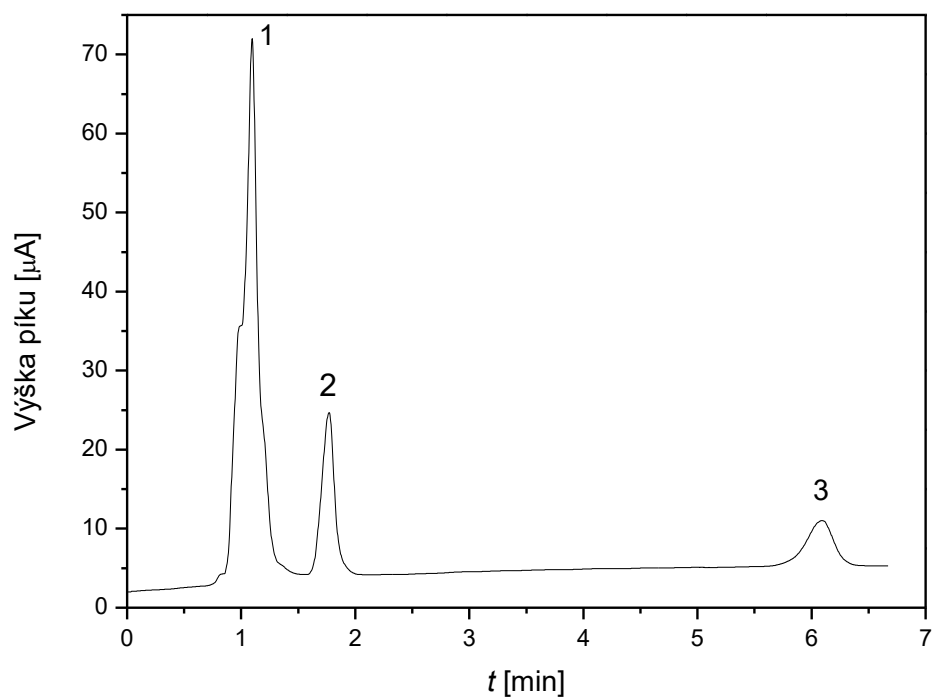


Obr. 2 – Chromatogram izokratické separace antioxidantů na koloně

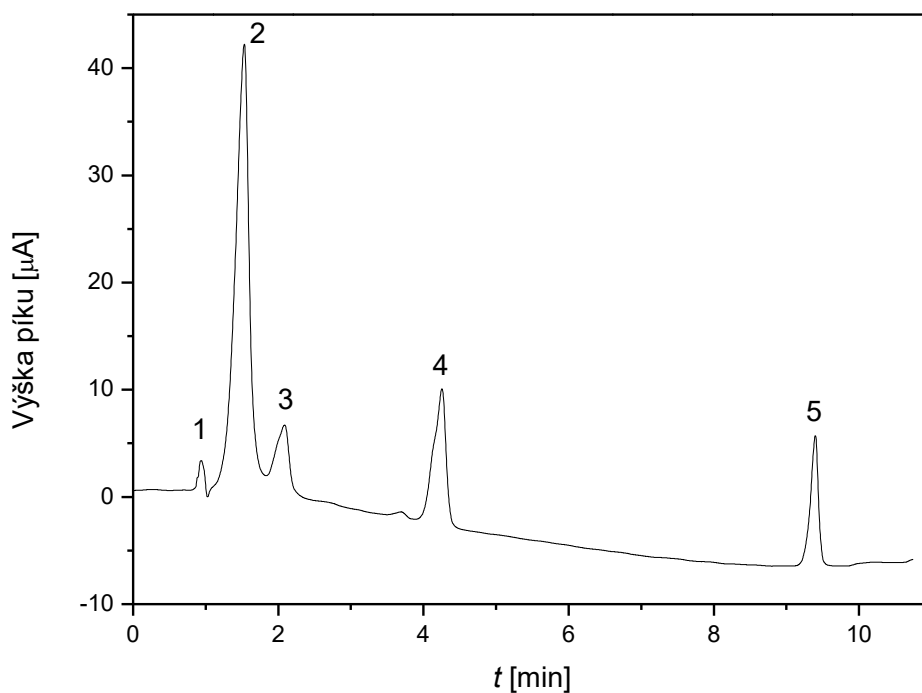
Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) v MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 2,5)

– 60/40 (v/v), 1,0 ml min⁻¹, λ = 280 nm. Pořadí píků: 1. mrtvý objem, 2. PG, 3. tBHQ,

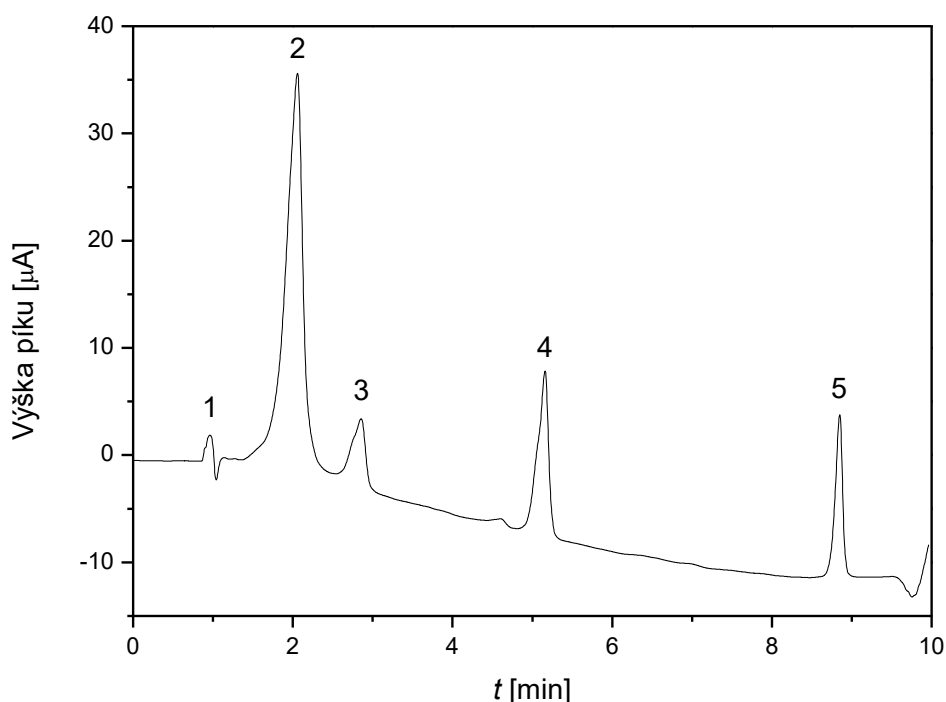
4. BHA



Obr. 3 – Chromatogram izokratické separace antioxidantů na koloně Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) v MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 2,5) – 80/20 (v/v), 1,0 ml min⁻¹, λ = 280 nm. Pořadí píků: 1. mrtvý objem, 2. BHA, 3. BHT



Obr. 4 – Chromatogram gradientové separace antioxidantů na koloně Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) v MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 2,5) – Gradient 55/45-95/5 (0-10 min), 1,0 ml min⁻¹, λ = 280 nm. Pořadí píků: 1. mrtvý objem, 2. PG, 3. tBHQ, 4. BHA, 5. BHT



Obr. 5 - Chromatogram gradientové separace antioxidantů na koloně

Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) v MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 2,5) – Gradient 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹, λ = 280 nm. Pořadí píků: 1. mrtvý objem, 2. PG, 3. tBHQ, 4. BHA, 5. BHT

Gradientová eluce umožňuje nastavení takových počátečních a konečných obsahů organické složky v mobilní fázi, aby byly píky dostatečně odděleny a zároveň došlo k vymytí všech analytů z kolony. Nejvhodnějším použitým gradientovým programem je postupné zvyšování methanolové složky z 55 % na 95 % během 8 minut a následné udržování tohoto obsahu po dobu 2 minut, což umožní vymytí případných dalších silně se sorbujících látek a zároveň dojde k oddělení PG a tBHQ jak je patrné na obr. 5. Případné použití vyššího počátečního obsahu methanolové složky v mobilní fázi nevede k dostatečné separaci prvních dvou analytů (viz obr. 4).

4.2 Vliv pH a potenciálu pracovní elektrody

Klíčovými parametry pro výběr vhodných podmínek stanovení, sledovaných v této části, bylo nalezení takového pH a potenciálu, vloženého na pracovní elektrodu, při kterých je signál (výška píku) nejvyšší.

Závislosti na pH mobilní fáze byly hledány při hodnotách 2,5, 4,5 a 6,5. Vliv pH na sledované parametry je malý, jak v případě odezvy elektrody, tak v případě retenčních časů (viz tab. 4). Pozorovatelný je běžný posun minimálního potenciálu potřebného k detekci analytu a zároveň posun nejvyššího detekovaného signálu směrem k nižším hodnotám potenciálu se zvyšujícím se pH. Každé zvýšení pH o 2 jednotky znamenalo posun potenciálu o 0,1 směrem doleva.

Tab. 4 - Závislost redukováných retenčních časů na pH mobilní fáze

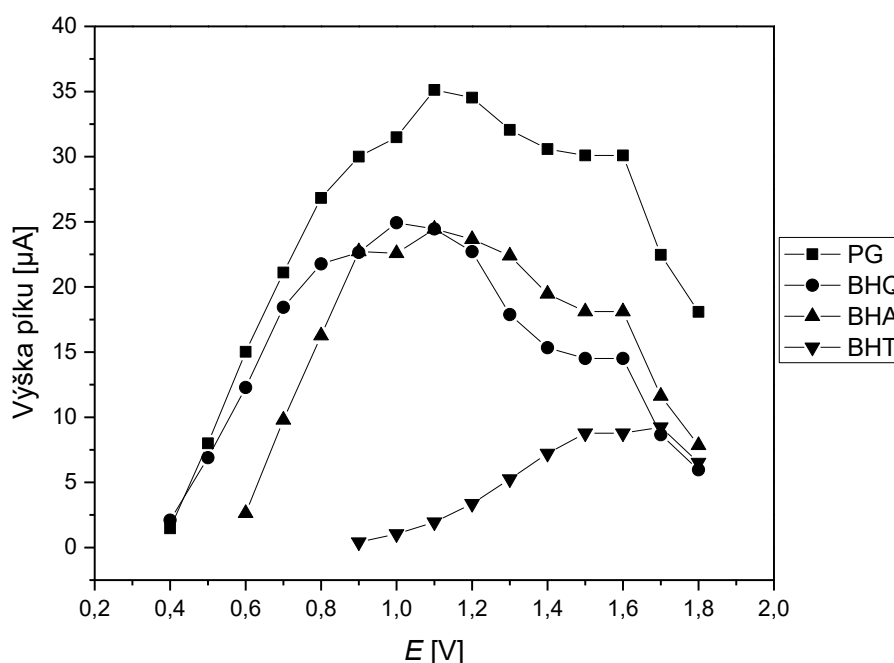
| Analyt | pH | t [min] $\pm L_{1,2}$ |
|--------|-----|-------------------------|
| PG | 2,5 | $0,84 \pm 0,01$ |
| | 4,5 | $0,79 \pm 0,02$ |
| | 6,5 | $0,88 \pm 0,01$ |
| tBHQ | 2,5 | $1,51 \pm 0,01$ |
| | 4,5 | $1,43 \pm 0,04$ |
| | 6,5 | $1,56 \pm 0,01$ |
| BHA | 2,5 | $3,68 \pm 0,03$ |
| | 4,5 | $3,54 \pm 0,08$ |
| | 6,5 | $3,73 \pm 0,02$ |
| BHT | 2,5 | $1,51 \pm 0,01$ |
| | 4,5 | $1,43 \pm 0,04$ |
| | 6,5 | $1,56 \pm 0,01$ |

Z hydrodynamických voltamogramů naměřených při výše uvedených hodnotách pH bylo jako nejvhodnější vybráno pH 4,5 jelikož zde píky téměř všech látek dosahovaly vyšších hodnot, než u pH 2,5 a 6,5 a zároveň nedocházelo k výkyvům, které jsou patrné u vyššího pH. Nejvyšších hodnoty signálu při všech pH měl PG, jehož maximum výšek se pohybovalo přibližně v rozmezí 30 až 40 μA , kterých bylo dosahováno při potenciálech

0,8 až 1,0 V. Zbylé dva antioxidanty (tBHQ a BHA) dosahovaly maxim při stejných hodnotách potenciálů, ovšem výšky jejich píků se pohybovaly v nižších hodnotách.

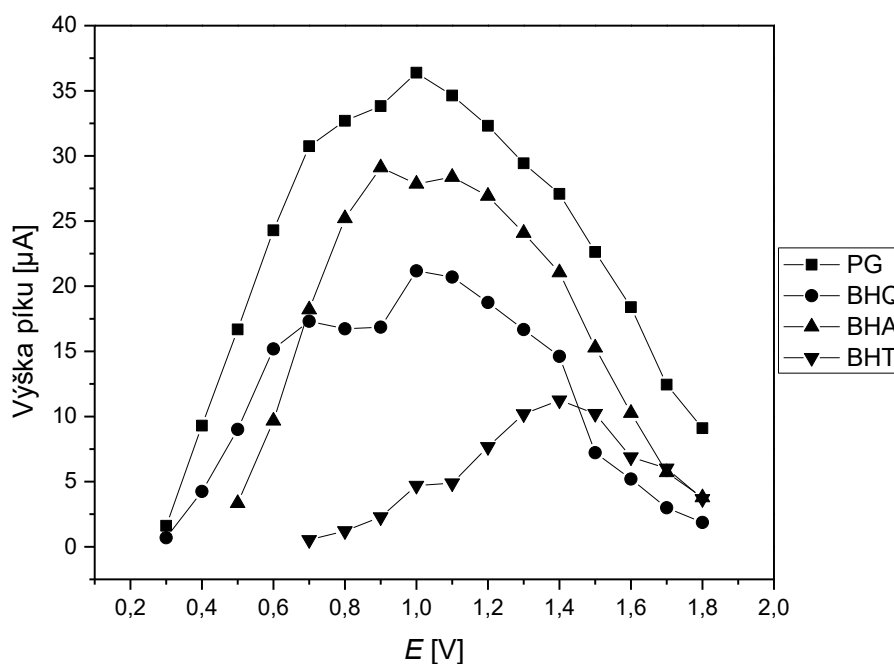
Zajímavým jevem je velmi nízká odezva BHT oproti ostatním látkám, kdy tato vlastnost velmi omezuje samotnou detekci a zvyšuje meze detekce a kvantifikace. BHT dosahovalo nejvyšších výšek píků při mnohem vyšších potenciálech než předchozí antioxidanty, a to při hodnotách přibližně 1,2 až 1,6 V. Z tohoto důvodu byla metoda rozdělena prakticky na dvě metody dílčí, sestávající ze stanovení PG, tBHQ a BHA při potenciálu 0,80 V a ze stanovení všech sledovaných látek při 1,40 V.

Na Obr. 9 je zobrazeno srovnání chromatogramů při potenciálech 0,80 V a 1,40 V, kde je jasné vidět zvýšení píku náležící BHT a zároveň je patrné zvýšení proudu pozadí a výraznější drift základní linie při použití vysokých potenciálů. Nevýhodou potenciálu 1,40 V je rovněž objevování nepravidelností základní linie (zde přibližně v 6,5 minutě).



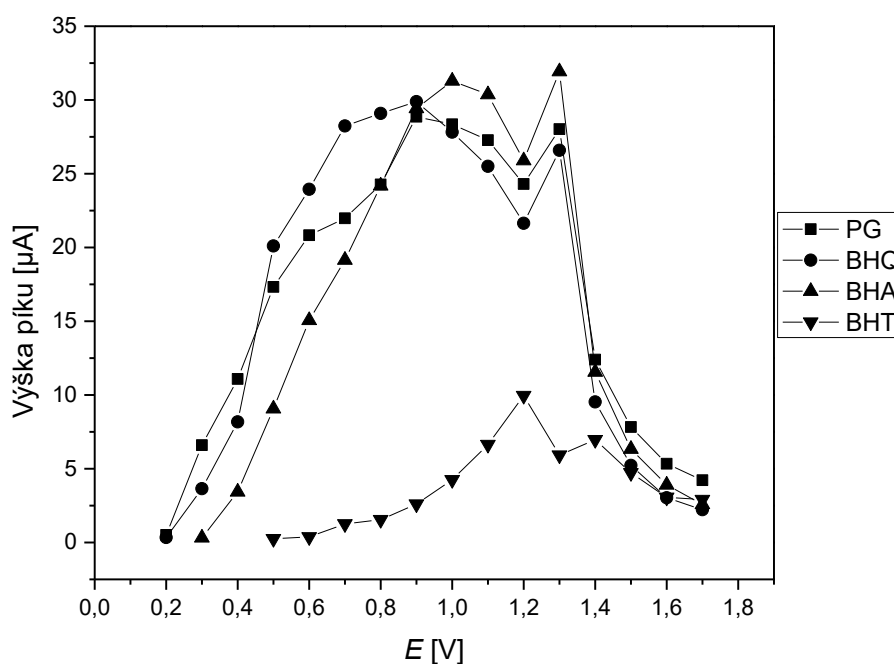
Obr. 6 - Hydrodynamické voltamogramy antioxidantů při pH = 2,5

Měřeno na koloně Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) při průtoku MF 1,0 ml min⁻¹
a gradientové eluci methanol/acetátovo-fosfátový pufr 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min)



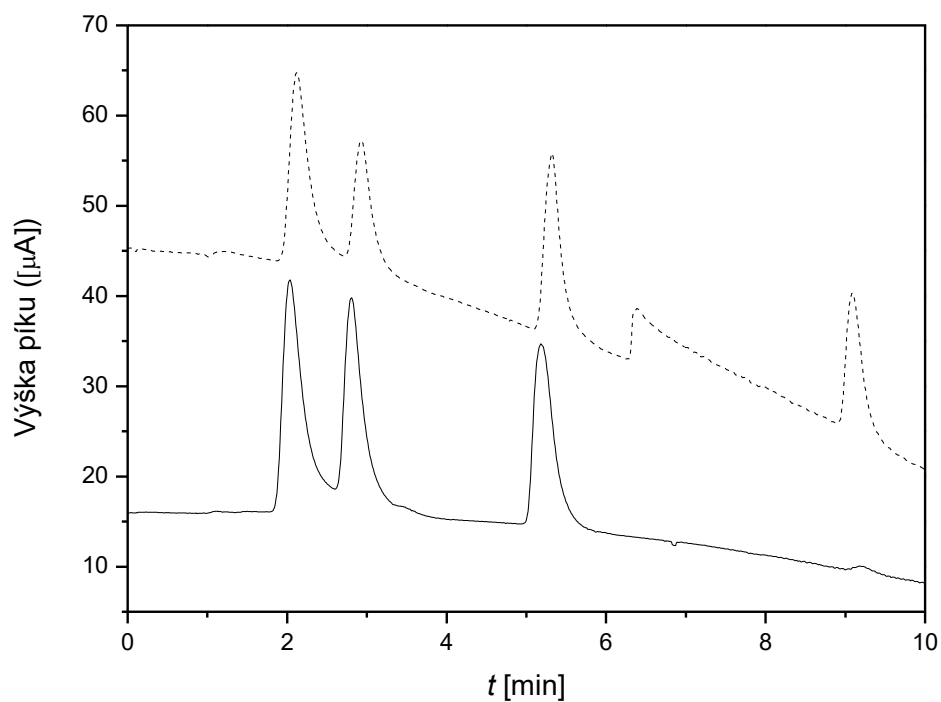
Obr. 7 - Hydrodynamické voltamogramy antioxidantů při pH = 4,5

Měřeno na koloně Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) při průtoku MF 1,0 ml min⁻¹ a gradientové eluci methanol/acetátovo-fosfátový pufr 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min)



Obr. 8 - Hydrodynamický voltamogram antioxidantů při pH = 6,5

Měřeno na koloně Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm) při průtoku MF 1,0 ml min⁻¹ a gradientové eluci methanol/acetátovo-fosfátový pufr 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min)



Obr. 9– Srovnání chromatogramů při potenciálu 0,80 V a 1,40 V.

Kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 µm) v MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – Gradient 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹.

Pořadí píků: 1. PG, 2. tBHQ, 3. BHA, 4. BHT

4.3 Opakovatelnost

Pro vyhodnocení opakovatelnosti měření byly použity výšky píků ekvimolárního roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Jednotlivá měření byla provedena celkem 10krát při každém potenciálu. Tyto hodnoty byly statisticky zpracovány (viz Tab. 5).

Při potenciálu 0,80 V bylo u všech látek, kromě BHT, dosaženo nižší relativní směrodatné odchylky, a tedy lepší opakovatelnosti měření, než u potenciálu 1,40 V. Tento fakt může být způsoben výrazným nárůstem driftu a nepravidelnosti základní linie a také vyšším šumem. Proto je v případě měření vzorků s obsahem BHT, které vyžadují k detekci potenciál 1,40 V, zapotřebí očekávat zatížení výsledku poměrně značnou chybou.

Tab. 5 - Vyhodnocení opakovatelnosti měření pro jednotlivé analyty

| Analyt | E [V] | Výška píku $\pm L_{1,2}$ [μA] | RSD [%] |
|--------|------------|---|------------|
| PG | 0,80 | $34,310 \pm 1,428$ | 5,88 |
| tBHQ | | $17,232 \pm 0,770$ | 6,31 |
| BHA | | $23,179 \pm 0,750$ | 4,57 |
| BHT | | $0,696 \pm 0,072$ | 14,61 |
| PG | 1,40 | $28,879 \pm 2,138$ | 10,46 |
| tBHQ | | $5,415 \pm 0,364$ | 9,51 |
| BHA | | $28,672 \pm 1,658$ | 8,17 |
| BHT | | $12,263 \pm 1,240$ | 14,29 |

4.4 Kalibrační závislosti

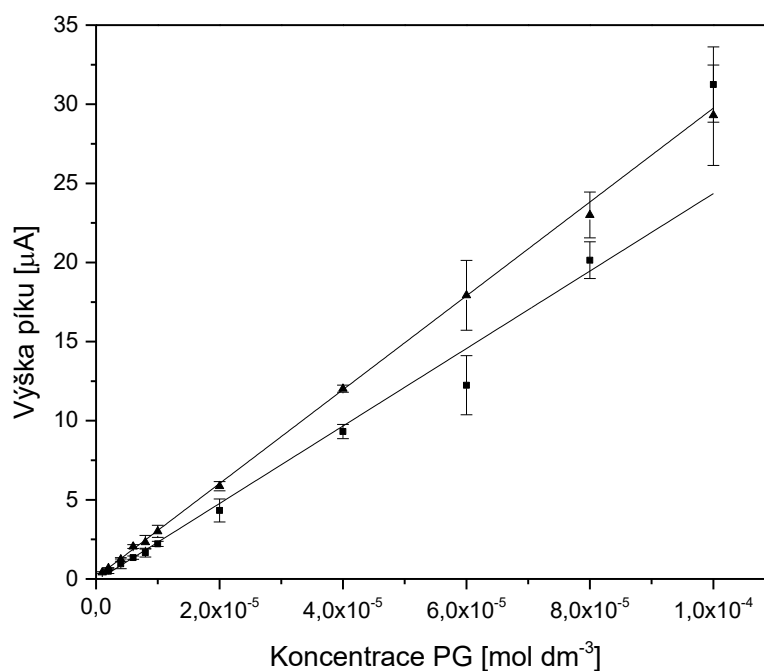
Kalibrační závislosti jednotlivých analytů byly získány proložením naměřených bodů přímkou. Citlivost kalibrace je dána hodnotou směrnice, kde platí, že čím je tato hodnota vyšší, tím je směrnice strmější a tím je metoda citlivější, jelikož se i malé změny v koncentraci projeví velkou změnou odezvy. Směrnice kalibračních závislostí PG, tBHQ a BHA vykazují větší směrnici při potenciálu 0,80 V, což je dáno jejich vyšší odezvou při této hodnotě. U BHT je rozdíl velikostí směrnic při různých potenciálech obzvláště patrná (viz obr. 13); při nižším potenciálu elektrodová reakce téměř neprobíhá, s čímž souvisí menší směrnice koncentrační závislosti; tento fakt prakticky znemožňuje stanovení BHT při potenciálu 0,80 V.

Meze detekce a stanovitelnosti jsou při potenciálu 1,40 V v důsledku zvýšených hodnot šumu základní linie vysoké; od hodnot získaných při potenciálu 0,80 V pro PG, tBHQ a BHA se liší přibližně dvojnásobně. Opačným případem je BHT, v důsledku nedostatečné citlivosti pro tento analyt při potenciálu 0,80 V jsou patrné až několikanásobné rozdíly meze detekce a stanovitelnosti mezi jednotlivými potenciály.

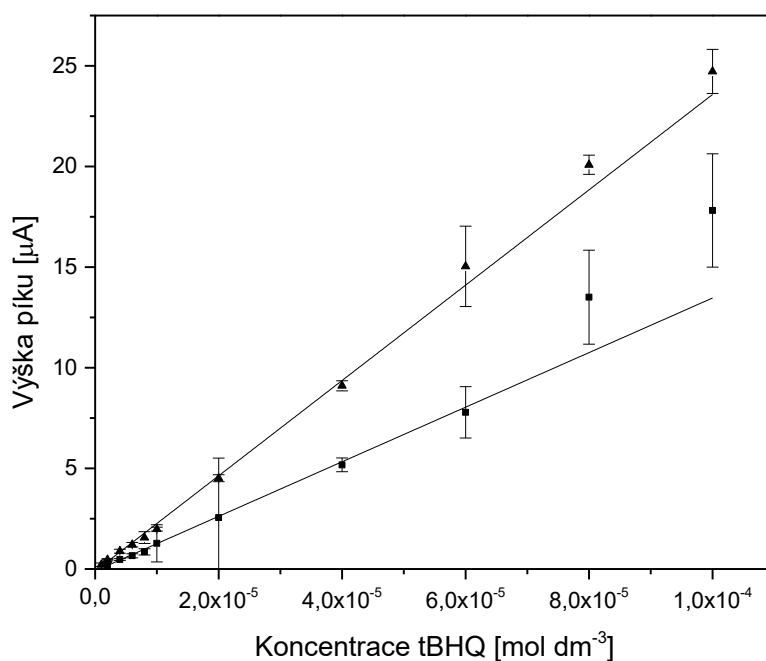
Přesnosti kalibračních závislostí pro PG, tBHQ a BHA jsou nižší při vyšším potenciálu, což je dáno větším rozptylem kolem jednotlivých kalibračních bodů jednotlivých přímk. Tento fakt je obzvláště patrný u kalibrační závislosti BHA (viz obr. 12), ovšem zde je to zapříčiněno nestabilitou základní linie při potenciálu 1,40 V, což při tomto potenciálu prakticky znemožňuje jeho stanovení ve vzorku. Kalibrační závislost pro BHT je nižší přesností zatížena při potenciálu 0,80 V, zejména pak při vyšších koncentracích, což je dalším faktorem, který snižuje přesnost kvantitativního vyhodnocení při tomto potenciálu.

Tab. 6 - Parametry kalibračních závislostí

| | E [V] | Směrnice [mA dm ³ mol ⁻¹] | Úsek [μA] | R | LOD [mol dm ⁻³] | LOQ [mol dm ⁻³] |
|------|------------|---|--------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|
| PG | 0,80 | 297 | 0,10 | 0,999 | $0,88 \cdot 10^{-6}$ | $0,30 \cdot 10^{-6}$ |
| | 1,40 | 245 | -0,13 | 0,983 | $1,86 \cdot 10^{-6}$ | $6,20 \cdot 10^{-6}$ |
| tBHQ | 0,80 | 237 | -0,11 | 0,993 | $1,21 \cdot 10^{-6}$ | $4,04 \cdot 10^{-6}$ |
| | 1,40 | 136 | -0,10 | 0,979 | $2,66 \cdot 10^{-6}$ | $8,87 \cdot 10^{-6}$ |
| BHA | 0,80 | 233 | 0,14 | 0,992 | $1,44 \cdot 10^{-6}$ | $4,81 \cdot 10^{-6}$ |
| | 1,40 | 201 | -1,12 | 0,769 | $3,48 \cdot 10^{-6}$ | $1,16 \cdot 10^{-5}$ |
| BHT | 0,80 | 9,5 | -0,28 | 0,776 | $3,13 \cdot 10^{-5}$ | $1,04 \cdot 10^{-4}$ |
| | 1,40 | 108 | -0,21 | 0,989 | $4,63 \cdot 10^{-6}$ | $1,54 \cdot 10^{-5}$ |

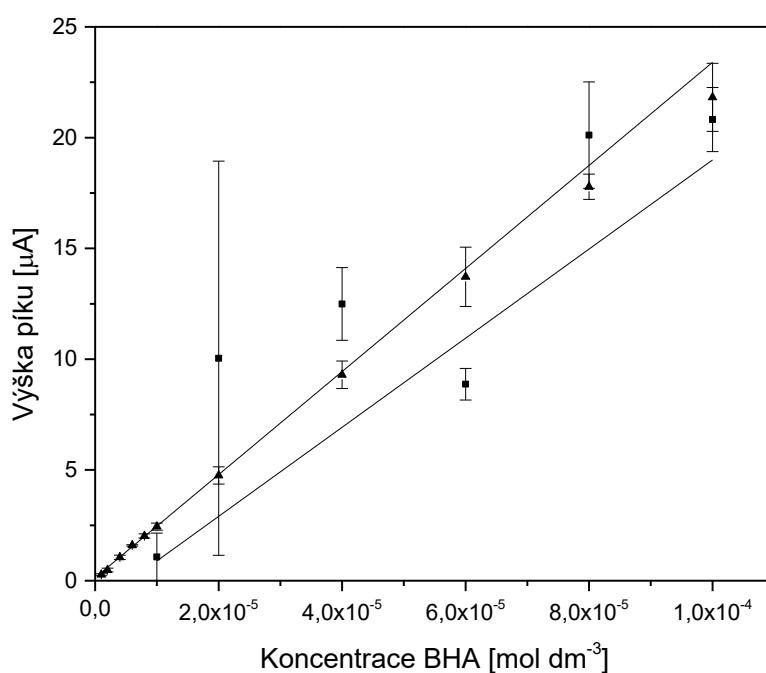
**Obr. 10** – Kalibrační závislosti PG vyjádřené výškami píků, získané při potenciálech 0,80 V (trojúhelníky) a 1,40 V (čtverce).

Kolona Lichrospher[®] RP-18 (125×4 mm, 5 μm), gradientový program methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹.



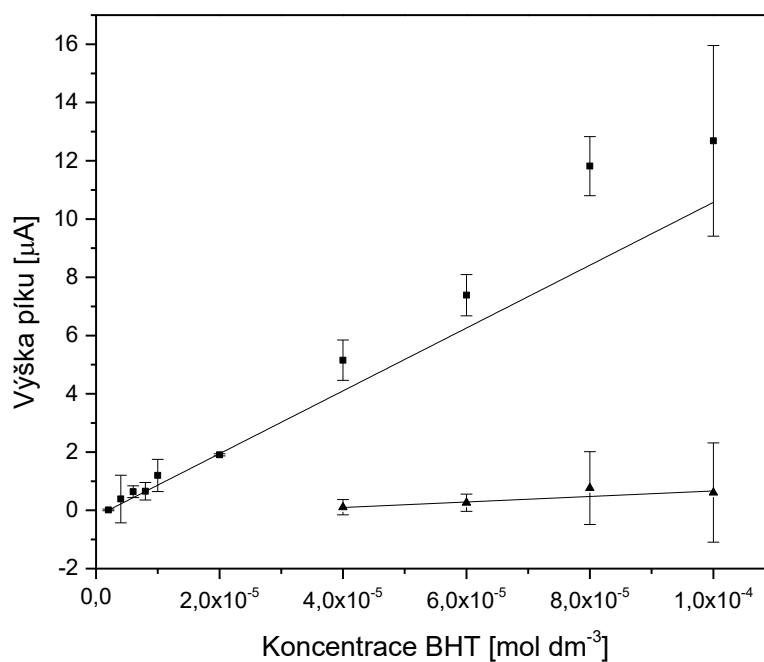
Obr. 11 – Kalibrační závislosti tBHQ vyjádřené výškami píků, získané při potenciálech 0,80 V (trojúhelníky) a 1,40 V (čtverce).

Kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm), gradientový program methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹



Obr. 12 – Kalibrační závislosti BHA vyjádřené výškami píků, získané při potenciálech 0,80 V (trojúhelníky) a 1,40 V (čtverce).

Kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm), gradientový program methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹.



Obr. 13 – Kalibrační závislosti BHT vyjádřené výškami píků, získané při potenciálech 0,80 V (trojúhelníky) a 1,40 V (čtverce).

Kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm), gradientový program methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹.

4.5 Stanovení v oleji

Výtěžnost metody při extrakci antioxidantů ze vzorků oleje byla sledována na vzorku řepkového oleje na třech koncentračních hladinách, kdy obsah analytů ve vzorku oleje byl zvýšen o přídavek přibližně 100, 10 a 1 mg dm⁻³ každého antioxidantu. Extrakce byla prováděna pouze pomocí jednoho extrakčního kroku, kdy byly 2 ml obohaceného vzorku extrahovány 2 ml methanolu jako extrakčního činidla, který byl následně ředěn 1:1 deionizovanou vodou a filtrován přes diskový filtr. Samotné měření bylo prováděno při potenciálu 0,80 V pro PG, tBHQ a BHA a při 1,40 V pro BHT.

Na základě získaných dat (viz tab. 7) je patrné zvyšování výtěžnosti s klesající koncentrací antioxidantů ve vzorku. Tento fakt může být zapříčiněn lepším přechodem antioxidantů při menší koncentraci z olejové matrice do methanolu, ovšem nezanedbatelným parametrem je zvýšení rozptylu hodnot, z čehož plyne možná chybovost stanovení při nižších koncentracích.

Extrémním případem je BHT, jehož výtěžnost se při nejvyšší koncentraci pohybovala pouze v jednotkách procent (viz tab. 7) oproti ostatním analytům, kde tato hodnota byla 20,3 a 31,4 %. Z tohoto důvodu bylo možné BHT kvantifikovat pouze při přídavku 100 mg dm⁻³ antioxidantu do oleje, protože při nižších koncentracích jeho pík nebyl detekován.

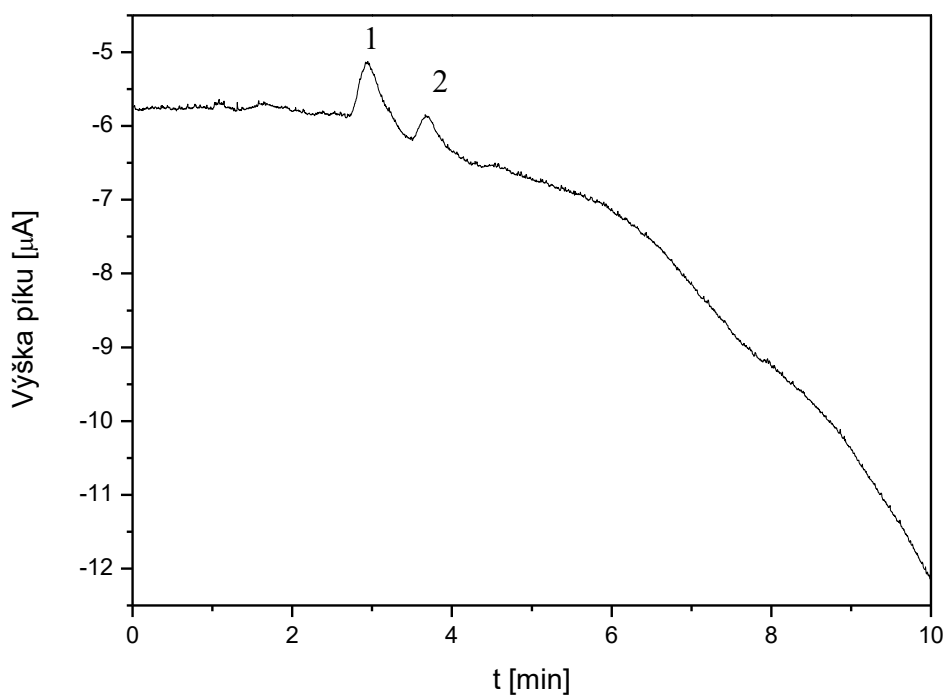
Tab. 7 - Výtěžnost extrakce při jednotlivých přídavcích antioxidantů

| | Přidáno [mg dm ⁻³] | Nalezeno [mg dm ⁻³] | Výtěžnost ± L _{1,2} [%] |
|------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| PG | 110,0 | 34,6 | 31,4 ± 2,1 |
| tBHQ | 113,0 | 27,2 | 24,1 ± 1,4 |
| BHA | 120,0 | 24,4 | 20,3 ± 0,5 |
| BHT | 114,0 | 6,3 | 5,6 ± 1,0 |
| PG | 11,0 | 5,6 | 50,5 ± 3,7 |
| tBHQ | 11,3 | 4,4 | 38,6 ± 5,1 |
| BHA | 12,0 | 4,8 | 39,7 ± 5,2 |
| PG | 1,10 | 0,83 | 75,2 ± 9,0 |
| tBHQ | 1,13 | 1,18 | 104,3 ± 5,7 |
| BHA | 1,20 | 1,00 | 83,0 ± 6,6 |

Obsah antioxidantů byl stanoven ve vzorku slunečnicového. Ze sledovaných látek byl nalezen pouze tBHQ a jeho obsah v tomto vzorku byl mnohem nižší, než jsou maximální povolené limity. To může být způsobeno záměrným snižováním obsahu syntetických antioxidantů a jejich postupným nahrazováním antioxidanty přírodními, které jsou pro koncového uživatele méně rizikové.

Tab. 8 - Obsah antioxidantů ve slunečnicovém oleji

| Analyt | c [mg dm ⁻³] | s [mg dm ⁻³] | RSD [%] | $L_{1,2}$ [mg dm ⁻³] | Maximální povolený |
|--------|----------------------------|----------------------------|---------|----------------------------------|--|
| | | | | | obsah dle zákona [mg dm ⁻³] |
| tBHQ | 1,3 | 0,1 | 9,3 | 0,3 | 200 |



Obr. 14 - Chromatogram čistého vzorku oleje ($E = 0,80$ V).

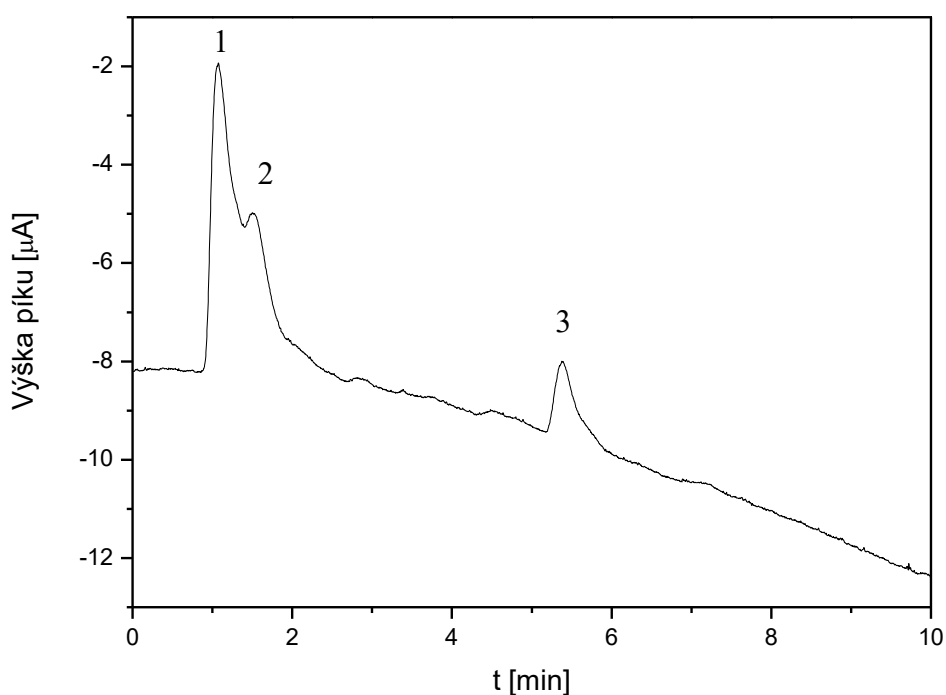
Kolona Lichrospher® RP-18 (125×4 mm, 5 μm), gradientový program methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5) – 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹.

Pořadí píků: 1. tBHQ, 2. neznámý pík

4.6 Stanovení v psích granulích

Jako druhý vzorek pro stanovení antioxidantů byly vybrány psí granule Bono[®], z důvodu známého maximálního množství BHA a BHT, deklarovaného výrobcem.

Nalezený obsah BHA (viz tab. 9) byl nižší, než je deklarovaná maximální koncentrace. Příčinou může být postupná degradace analytů vlivem jejich antioxidačního působení v matrici.



Obr. 15 - Chromatogram vzorku psích granulí Bono[®]. Kolona

Lichrospher[®] RP-18 (125×4 mm, 5 μm), MF methanol/acetátovo-fosfátový pufr (pH 4,5)

– Gradient 55/45-95/5-95/5 (0-8-10 min), 1,0 ml min⁻¹, $E = 0,80$ V.

Pořadí píků: 1. mrtvý objem, 2. neznámý pík, 3. BHA

Tab. 9 - Obsah antioxidantů v psích granulích Bono[®]

| Analyt | c [mg kg ⁻¹] | s [mg kg ⁻¹] | RSD [%] | $L_{1,2}$ [mol dm ⁻³] | Obsah dle výrobce [mg kg ⁻¹] |
|--------|----------------------------|----------------------------|---------|-----------------------------------|---|
| BHA | 12,5 | 0,8 | 6,7 | 1,8 | 40 |
| BHT | | | n.d. | | 40 |

Pozn.: n.d. – nebylo detekováno

5 Závěr

V této práci byly ověřovány parametry elektrochemického detektoru na bázi uhlíkové plsti. Metoda byla testována na stanovování syntetických fenolických antioxidantů (PG, tBHQ, BHA a BHT), za předchozí separace na HPLC koloně.

V prvním kroku byly, pomocí spektrometrického detektoru měřícím při vlnové délce 280 nm, nalezeny nejvhodnější separační podmínky. Za ty byla zvolena gradientová eluce, kdy se obsah methanolové složky během 8 minut lineárně zvyšoval z 55 % na 95 %. Následoval krok, kdy byl 2 minuty držen obsah methanolové složky na výše uvedených 95 %. Takto nastavený program umožnil separaci všech čtyř studovaných analytů.

V dalším kroku byly hledány optimální podmínky pro coulometrickou detekci. Těmito podmínkami bylo pH mobilní fáze a potenciál vkládaný na pracovní elektrodu z uhlíkové plsti. Za nejvhodnější podmínky pro další měření bylo určeno $\text{pH} = 4,5$ a potenciály vložené na pracovní elektrodu 0,80 V a 1,40 V. Dva potenciály byly zvoleny kvůli nízkému signálu BHT při nižších potenciálech. Naopak zbylé tři analyty (PG, tBHQ a BHA) měly při vyšších potenciálech sníženou opakovatelnost. Zajímavým faktem ovšem je schopnost plsti měřit právě při takto vysokém potenciálu, aniž by docházelo k poškození materiálu detektoru. Při žádném z potenciálů rovněž nebyla zaznamenána pasivace povrchu plsti

Kalibrační závislosti jednotlivých analytů byly měřeny v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Vybrané meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé analyty jsou stručně shrnuty v Tab. 10. Získané kalibrační závislosti pro tBHQ a BHA byly použity ke stanovení sledovaných analytů ve dvou reálných vzorcích.

Tab. 10 - Shrnutí LOD a LOQ pro jednotlivé analyty a potenciály

| | $E \text{ [V]}$ | $\text{LOD} [\text{mol dm}^{-3}]$ | $\text{LOQ} [\text{mol dm}^{-3}]$ |
|------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| PG | 0,80 | $0,88 \cdot 10^{-6}$ | $0,30 \cdot 10^{-6}$ |
| tBHQ | | $1,21 \cdot 10^{-6}$ | $4,04 \cdot 10^{-6}$ |
| BHA | | $1,44 \cdot 10^{-6}$ | $4,81 \cdot 10^{-6}$ |
| BHT | 1,40 | $4,63 \cdot 10^{-6}$ | $1,54 \cdot 10^{-5}$ |

Získané meze detekce a stanovitelnosti jsou dostačující pro vybrané aplikace, tj. zejména pro použití při analýze potravin na přítomnost těchto antioxidantů. Zároveň jsou tyto hodnoty srovnatelné s jinými elektrochemickými detekcemi a nižší než meze získané

při použití spektrometrických detekcí, které jsou uvedeny v teoretické části práce. Limitujícím faktorem pro stanovení je nedostatečná extrakční účinnost analytů z reálných vzorků.

Pro další práce s uhlíkovou plstí je uvažováno zmenšení velikosti detektoru za použití buď sériově vyráběných dílů, případně za využití relativně nové metody 3D tisku a vytištění detektoru. Tím by se mohlo docílit snížení objemu pufru potřebného ke zprostředkování vodivého spojení mezi elektrodami a zároveň zvýšení citlivosti. Dalším zajímavou možností by mohla být případná úprava samotné uhlíkové plsti tak, aby se usnadnily elektrochemické procesy na jejím povrchu.

6 Seznam použité literatury

1. Karovičová, J. a P. Šimko, *Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **882**(1-2): p. 271-281.
2. Saad, B., Y. Sing, M. Nawi, N. Hashim, A. Mohamedali, M. Saleh, S. Sulaiman, K. Talib a K. Ahmad, *Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC*. Food Chemistry, 2007. **105**(1): p. 389-394.
3. Perrin, C. a L. Meyer, *Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection*. Food Chemistry, 2002. **77**(1): p. 93-100.
4. Kim, J.-M., S.-H. Choi, G.-H. Shin, J.-H. Lee, S.-R. Kang, K.-Y. Lee, H.-S. Lim, T.S. Kang a O.-H. Lee, *Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea*. Food Chemistry, 2016. **213**: p. 19-25.
5. Chen, M., X. Hu, Z. Tai, H. Qin, H. Tang, M. Liu a Y. Yang, *Determination of Four Synthetic Phenolic Antioxidants in Edible Oils by High-Performance Liquid Chromatography with Cloud Point Extraction Using Tergitol TMN-6*. Food Analytical Methods, 2012. **6**(1): p. 28-35.
6. Lü, J.-M., P.H. Lin, Q. Yao a C. Chen, *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2010. **14**(4): p. 840-860.
7. EU, *Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídavných látkách*.
8. EU, *Nařízení komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídavných látek Unie*.
9. Smith, J. a L. Hong-Shum, *Food additives data book*. 2011, Chichester: Wiley-Blackwell.
10. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com>.
11. André, C., I. Castanheira, J.M. Cruz, P. Paseiro a A. Sanches-Silva, *Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review*. Trends in Food Science & Technology, 2010. **21**(5): p. 229-246.
12. Guan, Y., Q. Chu, L. Fu, T. Wu a J. Ye, *Determination of phenolic antioxidants by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection*. Food Chemistry, 2006. **94**(1): p. 157-162.
13. Guan, Y., Q. Chu, L. Fu a J. Ye, *Determination of antioxidants in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 2005. **1074**(1-2): p. 201-204.
14. Lin, X., Y. Ni a S. Kokot, *Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants*. Analytica Chimica Acta, 2013. **765**: p. 54-62.

15. Wang, H. a W. Liu, *Optimization of a high-performance liquid chromatography system by artificial neural networks for separation and determination of antioxidants*. Journal of Separation Science, 2004. **27**(14): p. 1189-1194.
16. Xu, S.J., F.N. Chen, M. Deng a Y.Y. Sui, *Simple simultaneous determination of butylated hydroquinone (TBHQ) and butylated hydroxyanisole (BHA) antioxidants in oil using high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection*. Luminescence, 2014. **29**(8): p. 1027-1032.
17. Xu, S., L. Liu, Y. Wang, D. Zhou, M. Kuang, D. Fang, W. Yang, S. Wei, A. Xiao a L. Ma, *Simultaneous determination of six synthetic phenolic antioxidants in edible oils using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with diode array detection*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(16): p. 3205-3211.
18. Bianchi, L., M.A. Colivicchi, L. DellaCorte, M. Valoti, G.P. Sgaragli a P. Bechi, *Measurement of synthetic phenolic antioxidants in human tissues by high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection*. Journal of Chromatography B, 1997. **694**(2): p. 359-365.
19. Ni, Y.N., L. Wang a S. Kokot, *Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches*. Analytica Chimica Acta, 2000. **412**(1-2): p. 185-193.
20. dos Santos Raymundo, M., M. Marques da Silva Paula, C. Franco a R. Fett, *Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques*. LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(7): p. 1133-1139.
21. Freitas, K.H.G. a O. Fatibello-Filho, *Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin*. Talanta, 2010. **81**(3): p. 1102-1108.
22. Rafecas, M., F. Guardiola, M. Illera, R. Codony a J. Boatella, *Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products*. Journal of Chromatography A, 1998. **822**(2): p. 305-309.
23. Chen, M., Q. Xia, M. Liu a Y. Yang, *Cloud-Point Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Synthetic Phenolic Antioxidants in Edible Oils*. Journal of Food Science, 2011. **76**(1): p. C98-C103.
24. Beinrohr, E., *Flow-through coulometry as a calibrationless method in inorganic trace analysis*. Accreditation and Quality Assurance, 2001. **6**(7): p. 321-324.
25. Beinrohr, E., M. Németh, P. Tschöpel a G. Tölg, *Design and characterization of flow-through coulometric cells with porous working electrodes made of crushed vitreous carbon*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1992. **343**(7): p. 566-575.
26. Mika, J., J. Barek, J. Zima a H. Dejmeková, *New flow-through coulometric detector with renewable working electrode material for flow injection analysis and HPLC*. Electrochimica Acta, 2015. **154**: p. 397-403.

-
27. Beinrohr, E., P. Tschöpel, G. Tölg a M. Németh, *Flow-through anodic stripping coulometry and anodic stripping coulometry with collection for the simultaneous absolute determination of copper, lead, cadmium and zinc*. *Analytica Chimica Acta*, 1993. **273**(1-2): p. 13-25.
 28. Beinrohr, E., P. Csémi, F.J. Rojas a H. Hofbauerová, *Determination of manganese in water samples by galvanostatic stripping chronopotentiometry in a flow-through cell*. *The Analyst*, 1994. **119**(6): p. 1355-1359.
 29. Beinrohr, E., P. Csémi, A. Manová a J. Dzurov, *Absolute analysis of trace metals through galvanostatic stripping chronopotentiometry with signal accumulation*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1994. **349**(8-9): p. 625-632.
 30. Buffa, A., Y. Erel a D. Mandler, *Carbon Nanotube Based Flow-Through Electrochemical Cell for Electroanalysis*. *Analytical Chemistry*, 2016. **88**(22): p. 11007-11015.
 31. Chen, G., *Coulometric detector based on porous carbon felt working electrode for flow injection analysis*. *Talanta*, 2000. **53**(3): p. 651-660.
 32. Hasebe, Y., R. Imai, M. Hirono a S. Uchiyama, *Carbon Felt-based Bioelectrocatalytic Flow Detectors: Highly Sensitive Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide Using Adsorbed Peroxidase and Thionine*. *Analytical Sciences*, 2007. **23**(1): p. 71-74.
 33. Kato, K., K. Kano a T. Ikeda, *Electrochemical Characterization of Carbon Felt Electrodes for Bulk Electrolysis and for Biocatalyst-Assisted Electrolysis*. *Journal of The Electrochemical Society*, 2000. **147**(4): p. 1449.
 34. Chen, J.-Y., C.-L. Hsieh, N.-Y. Hsu, Y.-S. Chou a Y.-S. Chen, *Determining the Limiting Current Density of Vanadium Redox Flow Batteries*. *Energies*, 2014. **7**(9): p. 5863-5873.
 35. Wei, L., T.S. Zhao, G. Zhao, L. An a L. Zeng, *A high-performance carbon nanoparticle-decorated graphite felt electrode for vanadium redox flow batteries*. *Applied Energy*, 2016. **176**: p. 74-79.
 36. González-García, J., P. Bonete, E. Expósito, V. Montiel, A. Aldaz a R. Torregrosa-Maciá, *Characterization of a carbon felt electrode: structural and physical properties*. *Journal of Materials Chemistry*, 1999. **9**(2): p. 419-426.
 37. Smith, R.E.G., T.J. Davies, N.d.B. Baynes a R.J. Nichols, *The electrochemical characterisation of graphite felts*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2015. **747**: p. 29-38.